

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 01 août 2000 (01.08.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02826	Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPcb191/155
Date du dépôt international (jour/mois/année) 18 novembre 1999 (18.11.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 18 novembre 1998 (18.11.98)
Déposant CAYUELA, Chantal etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

06 juin 2000 (06.06.00)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé R. Forax
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

Translation
09/856969

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED
FEB 14 2001
TECH CENTER 1600
1600
1600

Applicant's or agent's file reference MJPcb191/155	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/FR99/02826	International filing date (day/month/year) 18 November 1999 (18.11.99)	Priority date (day/month/year) 18 November 1998 (18.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 35/74		
Applicant	COMPAGNIE GERVAIS DANONE	

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 June 2000 (06.06.00)	Date of completion of this report 07 August 2000 (07.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02826

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

 the international application as originally filed. the description. pages 1-11, as originally filed.

pages _____, filed with the demand.

pages _____, filed with the letter of _____.

pages _____, filed with the letter of _____.

 the claims. Nos. 1-9, as originally filed.

Nos. _____, as amended under Article 19.

Nos. _____, filed with the demand.

Nos. _____, filed with the letter of _____.

Nos. _____, filed with the letter of _____.

 the drawings. sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed.

sheets/fig _____, filed with the demand.

sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

 the description. pages _____ the claims. Nos. _____ the drawings. sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02826

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

**NOVELTY, INVENTIVE STEP AND INDUSTRIAL APPLICABILITY -
PCT ARTICLE 33(1) (2) (3) AND (4)**

1. **Claims 1-9 appear to be novel, inventive and industrially applicable in view of the prior art cited in the Search Report**

1.1 No single document of the prior art cited in the Search Report either describes or suggests:

(i) the use of a lactic acid bacteria strain capable of reducing the production of NO by enterocyte cultures preactivated by proinflammatory cytokines, and by bacterial LPS, to obtain a composition regulating the inflammatory response of enterocytes, as described in Claims 1-6, and/or

(ii) a method for screening of new lactic acid bacteria strains having properties for modulating non-specific immunity, characterised in that it comprises the selection of lactic acid bacteria strains capable of inhibiting the production of NO by enterocyte cultures

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/FR 99/02826

preactivated by proinflammatory cytokines, and by bacterial LPS, as described in Claims 7-9.

Hence Claims 1-9 can be considered novel, and inventive and, furthermore, industrially applicable.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

09/03/2003

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPcb191/155	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02826	Date du dépôt international (jour/mois/année) 18/11/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 18/11/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K35/74		
Déposant COMPAGNIE GERVAIS DANONE et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 4 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 		

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 06/06/2000	Date d'achèvement du présent rapport 07.08.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Fayos, C N° de téléphone +49 89 2399 2180



RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/02826

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-11 version initiale

Revendications, N°:

1-9 version initiale

Dessins, feuilles:

1/4-4/4 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description, pages :
- des revendications, n°s :
- des dessins, feuilles :

3. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02826

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-9
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-9
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-9
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

**NOUVEAUTÉ, ACTIVITÉ INVENTIVE et POSSIBILITÉ D'APPLICATION INDUSTRIELLE
- Art. 33 (1) (2) (3) et (4) PCT**

1- Les revendications 1-9 paraissent être nouvelles, inventives et industriellement applicables au vu de l'art antérieur cité dans le rapport de recherche.

1.1- Aucun des documents de l'art antérieur cité dans le rapport de recherche ne décrit ni suggère:

- (i) l'utilisation d'une souche de bactérie lactique capable de diminuer la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines proinflammatoires et des LPS bactériens, pour l'obtention d'une composition régulatrice de la réponse inflammatoire des entérocytes tel qu'il est décrit dans les revendications 1-6 et / ou
- (ii) Un procédé de criblage de nouvelles souches de bactéries lactiques dotées de propriétés modulatrices de l'immunité non-spécifique, caractérisé en ce qu'il comprend la sélection de souches de bactéries lactiques capables d'inhiber la production de NO par de cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens tel qu'il est décrit dans les revendications 7-9.

C'est pourquoi les revendications 1-9 peuvent être considérées nouvelles et inventives et présentent en outre la possibilité d'application industrielle.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 35/74, A23C 9/123, C12Q 1/02, A61P 29/00, 1/00		A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/28943 (43) Date de publication internationale: 25 mai 2000 (25.05.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02826</p> <p>(22) Date de dépôt international: 18 novembre 1999 (18.11.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/14471 18 novembre 1998 (18.11.98) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): COMPAGNIE GERVAIS DANONE [FR/FR]; 126-130, rue Jules Guesde, F-92302 Levallois-Perret (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): CAYUELA, Chantal [FR/FR]; 20, rue Spontini, F-75016 Paris (FR). DUGAS, Nathalie [FR/FR]; 4, square des Muses, F-91370 Verrières-Le-Buisson (FR). POSTAIRE, Eric [FR/FR]; 4, villa des Nouzeaux, F-92170 Vanves (FR).</p> <p>(74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p>			
<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p> <p>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 20 juillet 2000 (20.07.00)</p>			

(54) Title: SELECTION AND USES OF LACTIC ACID BACTERIA STRAINS MODULATING NON-SPECIFIC IMMUNITY

(54) Titre: SELECTION ET UTILISATIONS DE SOUCHES DE BACTERIES LACTIQUES MODULATRICES DE L'IMMUNITE NON-SPECIFIQUE

(57) Abstract

The invention concerns lactic acid bacteria strains capable of regulating the production of NO and inflammatory cytokines by enterocytes, depending on the inflammatory condition of said enterocytes. Said strains can also be incorporated in food supplements such as fermented dairy products used for regulating inflammatory response and non-specific immunity.

(57) Abrégé

L'invention concerne des souches de bactéries lactiques capables de réguler la production de NO et de cytokines inflammatoires par des entérocytes, selon l'état inflammatoire de ces entérocytes. Ces souches peuvent être incorporées dans des compléments alimentaires tels que des produits laitiers fermentés utilisables pour réguler la réponse inflammatoire et l'immunité non-spécifique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettone	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbekistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yugoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 99/02826A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K35/74 A23C9/123 C12Q1/02 A61P29/00 A61P1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	T. WITTHÖFT ET AL.: "ENTEROINVASIVE BACTERIA DIRECTLY ACTIVATE EXPRESSION OF iNOS AND NO PRODUCTION IN HUMAN COLON EPITHELIAL CELLS." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY, vol. 38, no. 3, September 1998 (1998-09), pages G564-G571, XP002115076 WASHINGTON, DC, US cited in the application page G568, left-hand column, paragraph 2 -page G569, right-hand column, paragraph 3	1-9
A	WO 98 27991 A (LABORATOIRES STANDA S.A.) 2 July 1998 (1998-07-02) claims -/-	1-9

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 May 2000

Date of mailing of the international search report

18/05/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentstaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02826

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 20607 A (COMPAGNIE GERVAIS DANONE) 11 July 1996 (1996-07-11) cited in the application claims —	1-9
P, X	E. POSTAIRE ET AL.: "ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE MUCOSAL IMMUNO-REGULATORY PROPERTIES OF PROBIOTIC STRAINS." FASEB JOURNAL FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, vol. 13, no. 4, 12 March 1999 (1999-03-12), page A291 XP002137007 BETHESDA, MD US abstract n°. 245.27 —	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02826

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9827991	A 02-07-1998	FR 2764801	A	24-12-1998
		FR 2764802	A	24-12-1998
		AU 5669098	A	17-07-1998
		EP 0951290	A	27-10-1999
		FR 2764803	A	24-12-1998
		PL 334277	A	14-02-2000
WO 9620607	A 11-07-1996	FR 2728912	A	05-07-1996
		FR 2739869	A	18-04-1997
		AT 173135	T	15-11-1998
		AU 4489696	A	24-07-1996
		CA 2209335	A	11-07-1996
		DE 69506002	D	17-12-1998
		DE 69506002	T	24-06-1999
		EP 0794707	A	17-09-1997
		ES 2126962	T	01-04-1999
		GR 3029312	T	28-05-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. la Internationale No

PCT/FR 99/02826

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K35/74 A23C9/123

C12Q1/02

A61P29/00

A61P1/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>T. WITTHÖFT ET AL.: "ENTEROINVASIVE BACTERIA DIRECTLY ACTIVATE EXPRESSION OF iNOS AND NO PRODUCTION IN HUMAN COLON EPITHELIAL CELLS." <i>AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY</i>, vol. 38, no. 3, septembre 1998 (1998-09), pages G564-G571, XP002115076 WASHINGTON, DC, US cité dans la demande page G568, colonne de gauche, alinéa 2 —page G569, colonne de droite, alinéa 3</p>	1-9
A	<p>WO 98 27991 A (LABORATOIRES STANDA S.A.) 2 juillet 1998 (1998-07-02) revendications — —/—</p>	1-9

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 mai 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/05/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Do. de Internationale No
PCT/FR 99/02826

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 20607 A (COMPAGNIE GERVAIS DANONE) 11 juillet 1996 (1996-07-11) cité dans la demande revendications	1-9
P, X	E. POSTAIRE ET AL.: "ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE MUCOSAL IMMUNO-REGULATORY PROPERTIES OF PROBIOTIC STRAINS." FASEB JOURNAL FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, vol. 13, no. 4, 12 mars 1999 (1999-03-12), page A291 XP002137007 BETHESDA, MD US * résumé no. 245.27 *	1-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Date Internationale No

PCT/FR 99/02826

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9827991	A 02-07-1998	FR 2764801	A 24-12-1998	
		FR 2764802	A 24-12-1998	
		AU 5669098	A 17-07-1998	
		EP 0951290	A 27-10-1999	
		FR 2764803	A 24-12-1998	
		PL 334277	A 14-02-2000	
WO 9620607	A 11-07-1996	FR 2728912	A 05-07-1996	
		FR 2739869	A 18-04-1997	
		AT 173135	T 15-11-1998	
		AU 4489696	A 24-07-1996	
		CA 2209335	A 11-07-1996	
		DE 69506002	D 17-12-1998	
		DE 69506002	T 24-06-1999	
		EP 0794707	A 17-09-1997	
		ES 2126962	T 01-04-1999	
		GR 3029312	T 28-05-1999	



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/28943 (43) Date de publication internationale: 25 mai 2000 (25.05.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02826 (22) Date de dépôt international: 18 novembre 1999 (18.11.99)			(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet AR IPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(30) Données relatives à la priorité: 98/14471 18 novembre 1998 (18.11.98) FR			Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): COMPAGNIE GERVAIS DANONE [FR/FR]; 126-130, rue Jules Guesde, F-92302 Levallois-Perret (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): CAYUELA, Chantal [FR/FR]; 20, rue Spontini, F-75016 Paris (FR). DUGAS, Nathalie [FR/FR]; 4, square des Muses, F-91370 Verrières-Le-Buisson (FR). POSTAIRE, Eric [FR/FR]; 4, villa des Nouzeaux, F-92170 Vanves (FR).			
(74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: SELECTION AND USES OF LACTIC ACID BACTERIA STRAINS MODULATING NON-SPECIFIC IMMUNITY

(54) Titre: SELECTION ET UTILISATIONS DE SOUCHES DE BACTERIES LACTIQUES MODULATRICES DE L'IMMUNITE NON-SPECIFIQUE

(57) Abstract

The invention concerns lactic acid bacteria strains capable of regulating the production of NO and inflammatory cytokines by enterocytes, depending on the inflammatory condition of said enterocytes. Said strains can also be incorporated in food supplements such as fermented dairy products used for regulating inflammatory response and non-specific immunity.

(57) Abrégé

L'invention concerne des souches de bactéries lactiques capables de réguler la production de NO et de cytokines inflammatoires par des entérocytes, selon l'état inflammatoire de ces entérocytes. Ces souches peuvent être incorporées dans des compléments alimentaires tels que des produits laitiers fermentés utilisables pour réguler la réponse inflammatoire et l'immunité non-spécifique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

SELECTION ET UTILISATIONS DE SOUCHES DE BACTERIES
LACTIQUES MODULATRICES DE L'IMMUNITE NON-SPECIFIQUE

L'invention est relative à l'utilisation de bactéries lactiques en tant que régulateurs de 5 l'inflammation de la muqueuse intestinale.

Les bactéries lactiques sont traditionnellement utilisées pour fabriquer des produits alimentaires fermentés, en particulier des produits laitiers.

10 Il a été rapporté qu'outre leurs qualités nutritionnelles, certains de ces produits alimentaires exerçaient des effets bénéfiques sur la santé ; ces propriétés ont fait l'objet d'un intérêt particulier depuis quelques décennies, et de nombreuses recherches 15 ont été effectuées dans le but de les confirmer, et de définir plus précisément le rôle joué par les fermentes lactiques.

Il a ainsi été montré que certaines bactéries lactiques, notamment parmi les lactobacilles et des 20 bifidobactéries, amélioraient l'immunité vis-à-vis d'agents infectieux [PAUBERT-BRAQUET et al., Int. J. Immunother. 11, 153-161 (1995) ; KAILA et al., Dis. Child. 72, 51-53 (1995) ; HUDAULT et al. Appl. Environ. Microbiol. 63, 513-518 (1997)], et possédaient également 25 une activité antitumorale [HAYATSU et al. Cancer Lett. 73, 173-179(1993) ; HOSONO et al. Agric. Biol. Chem. 54, 1639-1643 (1990) ; HOSODA et al. J. Dairy Sci. 75, 976-981 (1992)].

Ces effets ont été notamment attribués à une 30 action sur la composition de la microflore intestinale, au détriment des microorganismes pathogènes, et/ou à une action plus directe sur le système immunitaire, se manifestant en particulier par une augmentation du taux de cytokines activatrices du système immunitaire telles 35 que l'IFNy ou des interleukines, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules activées intervenant dans la

réponse immune spécifique ou non-spécifique, telles que les lymphocytes et les macrophages, et une sécrétion accrue d'immunoglobulines [PERDIGON et al. Int. J. Immunother. 9, 29-52, (1993) ; PORTIER et al., Int. J. Immunother. 9, 217-224 (1993) ; SOLIS PEREYRA et LEMONNIER, Nutr. Research 13, 1127-1140 (1993)] ; DE SIMONE et al., Int. J. Immunother. 9, 23-28 20 (1993) ; PERDIGON et al. J. Dairy Res. 61, 553-562 (1994) ; SCHIFFRIN et al. J. Dairy Sci. 78, 491-497 (1995)].

10 Cependant, il apparaît que les effets bénéfiques induits par les bactéries lactiques peuvent varier selon l'origine de la pathologie concernée, l'espèce et/ou la souche bactérienne utilisée, et les conditions d'administration. Pour mieux adapter 15 l'utilisation de ces bactéries, ou des produits les contenant, dans le cadre du traitement ou de la prévention de pathologies spécifiques, et pour être en mesure de sélectionner les bactéries les plus appropriées à l'utilisation souhaitée, il est donc nécessaire de 20 mieux connaître les mécanismes par lesquels s'exercent leurs effets.

Les Inventeurs ont entrepris d'étudier l'effet sur la muqueuse intestinale de bactéries lactiques du groupe *Lactobacillus casei* ; ils ont choisi dans ce but 25 la souche de *L. casei* DN 114001. Cette souche est décrite dans la Demande PCT WO 96/20607 au nom de : COMPAGNIE GERVAIS DANONE, et a été déposée le 30 décembre 1994, auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du 30 Docteur Roux, à Paris, sous le numéro I-1518, et ses propriétés bénéfiques dans le cadre du traitement des diarrhées ont été montrées.

Les inventeurs ont étudié l'effet *in vitro* de cette souche de *L. casei* sur la production de médiateurs 35 de l'immunité non-spécifique (cytokines pro-

inflammatoires et oxyde nitrique) par des entérocytes en culture.

Ces lignées de cellules, qui sont issues de l'épithélium intestinal humain, constituent un modèle d'étude de la réponse de celui-ci à une agression, infectieuse ou autre. Cette réponse se manifeste notamment par la production de cytokines pro-inflammatoires (principalement IL-1, IL-6, TNF- α), et d'oxyde nitrique (NO), généré par une isoforme inductible de la NO synthase (iNOS). L'oxyde nitrique participe, par ses propriétés antimicrobiennes, à la défense contre les microorganismes pathogènes, et lorsqu'il est produit en faible quantité, à la protection de la muqueuse intestinale. Cependant, à forte dose, il diminue la viabilité des cellules épithéliales, et contribue à l'instauration et à l'entretien d'un état inflammatoire chronique [ALICAN et KUBES, Am. J. Physiol. 270, G225-237, (1996) ; TEPPERMAN et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 271, 1477-1482, (1994)]. La production de NO par les entérocytes en culture peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires [VALETTE et al., Br. J. Pharmacol., 121, 187-182 (1997) ; KOLIOS et al., Br. J. Pharmacol., 116, 2866-2872 (1995) , ainsi que par les toxines lipopolysaccharidiques (LPS) de certaines bactéries à gram négatif (TEPPERMAN et al., 1994, publication précitée). Des travaux récents [SALZMAN et al. Gastroenterology, 114, 93-102, (1998) ; WITTHOFT et al., Am. J. Physiol., 275, G564-571, (1998)] indiquent que les bactéries entéropathogènes *Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Shigella flexneri*, induisent l'expression de l'iNOS et la production de NO dans des cultures d'entérocytes, pré-activées ou non par des cytokines pro-inflammatoires.

Les inventeurs ont maintenant constaté que, dans le cas de leurs expérimentations avec *L. casei*, l'action sur la production de cytokines pro-

inflammatoires et de NO variait selon l'état d'activation des entérocytes. En effet, lorsque les cellules sont dans leur état basal, on n'observe aucun effet de *L. casei* ; lorsqu'elles sont activées par l'addition de cytokines 5 pro-inflammatoires (ce qui reproduit les conditions d'une agression, infectieuse ou autre), on observe une faible production de NO et de TNF ; cette réponse à l'agression est très significativement augmentée par l'addition de *L. casei*. Enfin, dans le cas de cellules hyperactivées par 10 l'addition de cytokines inflammatoires et de LPS (ce qui reproduit les conditions d'un état inflammatoire pathogène), on observe au contraire une diminution de la production de NO et de TNF, qui est ramenée à un niveau optimal.

15 Il apparaît donc que cette souche de *L. casei* favorise une réponse adaptative des cellules à une agression, par l'intermédiaire de la modulation de facteurs intervenant dans l'immunité non-spécifique.

La mise en évidence de ces propriétés permet 20 de proposer l'utilisation de la souche CNCM I-1518 de *L. casei*, et/ou de toute autre souche de bactérie lactique capable de diminuer la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens, pour l'obtention de 25 compositions régulatrices de la réponse inflammatoire des entérocytes, et en particulier inhibitrices d'une réponse inflammatoire pathogène.

Avantageusement, on utilisera une souche capable en outre d'augmenter la production de NO par des 30 cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires.

Les compositions obtenues sont utilisables pour la prévention ou le traitement de pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques de l'intestin 35 (colites, entérites, maladie de Crohn, rectocolites hémorragiques, etc.), que ces pathologies soient

d'origine infectieuse (induites par des bactéries, des virus, des levures, etc.) ou non ; elles sont particulièrement appropriées dans le cadre du traitement des états inflammatoires chroniques.

5 Conformément à l'invention, les bactéries lactiques peuvent être utilisées sous forme de bactéries entières vivantes ou non, sous forme de lysat bactérien, ou sous forme de fractions bactériennes ; les fractions bactériennes convenant à cette utilisation peuvent être 10 choisies en testant leurs propriétés d'augmentation de la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires, et de diminution de la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens.

15 Préférentiellement, ces compositions peuvent être administrées sous forme de compléments alimentaires. Il peut s'agir notamment de produits laitiers fermentés ; dans ce cas, les bactéries lactiques utilisées, 20 conformément à l'invention, pour l'obtention de ces compositions peuvent faire partie du ferment mis en œuvre pour l'obtention de ces produits laitiers.

25 On peut notamment utiliser des bactéries lactiques choisies parmi les lactobacilles, les lactocoques, les streptocoques et les bifidobactéries. Avantageusement, on utilise une souche de *L. casei*, et de préférence, la souche CNCM I-1518.

30 De nouvelles souches de bactéries lactiques dotées de propriétés modulatrices de l'immunité non-spécifique, et utilisables notamment pour l'obtention de compositions régulatrices de la réponse inflammatoire des entérocytes, peuvent être obtenues par la mise en œuvre d'un procédé de criblage comprenant la sélection de souches de bactéries lactiques capables de diminuer la 35 production de NO par des cultures d'entérocytes

préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens.

Avantageusement, ledit procédé comprend en outre une étape de sélection des souches capables 5 d'augmenter la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires, et optionnellement, une étape de sélection des souches n'exerçant aucun effet sur la production de NO par des entérocytes non-activés.

10 Selon un mode de mise en œuvre préféré du procédé conforme à l'invention, lesdites souches sont criblées à partir de cultures de bactéries lactiques choisies dans le groupe constitué par les lactobacilles, les lactocoques, les streptocoques et les 15 bifidobactéries.

L'invention englobe également les aliments et compléments nutritionnels, notamment les produits laitiers fermentés contenant ces nouvelles souches, ou des produits dérivés de celles-ci, notamment par lyse 20 et/ou fractionnement cellulaire.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant la mise en évidence des propriétés de la souche CNCM I-1518.

25 **PROTOCOLES EXPERIMENTAUX GENERAUX :**

Les cytokines recombinantes humaines (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , 10⁷ U/mg) utilisées proviennent de la société IMMUGENEX (Los Angeles, CA) ; le PDTC (inhibiteur de la formation du facteur de transcription NF κ -B), le L-NAME (inhibiteur des NO-synthases), et le 30 lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* proviennent de la société SIGMA (St Louis, MO).

Les kits de dosage par ELISA des cytokines IL-1 β , et TNF- α proviennent de la société BIOSOURCE.

35 Les extraits totaux de *L. casei* utilisés lors des expériences sont obtenus par sonication pendant 10

minutes de suspensions de la souche CNCM I-1518, afin de casser les bactéries.

Culture et stimulation des entérocytes :

Les 2 lignées de cellules de carcinome du 5 colon HT29 et Caco-2 ont été utilisées.

La lignée HT29, initialement isolée par FOGH et TREMPE (Human Tumor Cells *In Vitro*, 115-156, J. FOGH Ed, Plenum Press, New York, 1975) est disponible auprès de la collection ATCC, (Rockville USA), sous le numéro 10 ATCC HTB-38.

La lignée Caco-2, initialement isolée par FOGH (J. Natl. Cancer Inst. 58, 209-214, 1977) est disponible auprès de la collection ATCC, (Rockville USA), sous le numéro ATCC HTB-37.

15 Légendes des figures :

La figure 1 représente la production de NO par les cellules Caco-2, préactivées (●) ou non (○) par le CYTOMIX, ou par les cellules HT-29 préactivées (■) ou non (□) par le CYTOMIX, en présence de quantités croissantes 20 d'extrait total de la souche CNCM I-1518.

La figure 2 représente l'effet du L-NAME sur la production de NO par les cellules Caco-2 ou par les cellules HT-29 préactivées par le CYTOMIX, en présence ou non d'extrait total (3% v/v) de la souche CNCM I-1518.

25 (▨) + L-NAME
(■) Contrôle

La figure 3 représente l'effet du L-NAME et du PDTC sur la production de TNF par les cellules Caco-2 ou par les cellules HT-29 préactivées par le CYTOMIX, en 30 présence ou non d'extrait total (3% v/v) de la souche CNCM I-1518.

(▨) + L-NAME
(■) Contrôle
(▨) + PDTC

35 La figure 4 représente la production de NO par les cellules Caco-2, préactivées par le CYTOMIX seul (○)

ou par le CYTOMIX+LPS (●), ou par les cellules HT-29 préactivées par le CYTOMIX seul (□) ou par le CYTOMIX+LPS (■), en présence de quantités croissantes d'extrait total de la souche CNCM I-1518.

5 **EXEMPLE 1 : EFFET DE *L. CASEI* SUR LA PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE PAR LES LIGNEES DE CELLULES EPITHELIALES DU COLON.**

Chacune des 2 lignées a été ensemencée à 2×10^5 cellules/puits en plaques de 96 puits, en milieu DMEM supplémenté de 5% de SVF, de 100 U/ml de pénicilline, de 100 µg/ml de streptomycine et de 2 mM de L-glutamine.

10 Les cellules sont pré-incubées pendant 24 heures à 37°C, 5% de CO₂, en présence de CYTOMIX (mélange IL-1β : 10 ng/ml, TNF-α : 25 ng/ml, IFN-γ : 10³ U/ml). Les 15 cellules sont ensuite incubées pendant 24 heures supplémentaires en présence ou non de quantités croissantes d'extraits totaux de *L. casei* (en % vol/vol).

Après l'incubation, les surnageants de culture 20 sont récupérés et congelés avant la détermination de la concentration en nitrites. Pour certaines expériences, du L-NAME (1 mM), qui est un analogue de la L-arginine et 25 constitue un inhibiteur compétitif spécifique des NO-synthases est ajouté en même temps que les extraits de *L. casei*.

25 La quantité de NO produit est évaluée par le dosage dans les surnageants de culture, des dérivés stables de ce radical après sa réaction en milieu aqueux: les nitrites et les nitrates. Les nitrates sont dans un premier temps réduits en nitrites par des bactéries 30 exprimant la nitrate-réductase et les nitrites sont ensuite dosés par la méthode de GRIESS. A 100 µl de surnageant on ajoute 100 µl d'une solution composée de 1 volume d'une solution de sulfanilamide à 1% dans l'acide acétique à 30%, et de 1 volume d'une solution de 35 dichlorhydrate de N-1-naphtyl éthylènediamine à 0,1% dans l'acide acétique à 60%. Une courbe de calibration

standard est réalisée en présence de différentes concentrations de nitrite de sodium dilué dans du milieu de culture (DMEM 5%SVF). Les absorbances sont ensuite déterminées à 540 nm en utilisant un lecteur MULTISCAN 5 MCC340, (LABSYSTEM)

La figure 1 montre qu'en présence du CYTOMIX seul, on n'observe qu'une production limitée de NO par les lignées HT-29 et Caco-2 ; cette production est augmentée de façon dose-dépendante par l'addition de 10 l'extrait de *L. casei*. Un effet maximal est observé pour une concentration d'environ 3% (v/v) d'extrait de *L. casei*. En l'absence de CYTOMIX, *L. casei* n'a pas d'effet sur la production de NO par l'une ou l'autre des lignées.

La figure 2 montre que cette production 15 induite par le CYTOMIX est inhibée par l'addition de L-NAME, en présence ou non d'extrait total de *L. casei* (3% v/v).

EXEMPLE 2 : EFFET DE *L. CASEI* SUR LA PRODUCTION DE TNF- α PAR LES LIGNEES DE CELLULES EPITHELIALES DU COLON.

20 Chacune des 2 lignées a été ensemencée à 2×10^6 cellules/puits en plaques de 24 puits, en milieu DMEM supplémenté de 5% de SVF, de 100 U/ml de pénicilline, de 100 μ g/ml de streptomycine et de 2 mM de L-glutamine. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 heures en 25 présence de CYTOMIX, puis pendant 24 heures supplémentaires en présence des extraits totaux de *L. casei*. Pour certaines expériences, du L-NAME (1 mM) ou un inhibiteur de la voie de transduction NF κ B (le PDTC: 10 pM) sont ajoutés en même temps que les extraits 30 bactériens.

Les surnageants de culture sont ensuite récupérés et leur concentration en cytokines déterminées par ELISA.

35 La figure 3 montre qu'en présence du CYTOMIX seul, il n'y a qu'une faible production de TNF- α par la lignée Caco-2, et une absence de production de cette

cytokine par la lignée HT-29. Cette production est fortement augmentée, pour les deux lignées, par l'addition d'extrait total de *L. casei* ; elle est inhibée par l'addition de L-NAME ou de PDTC, ce qui montre que 5 l'activation de la production de cytokines pro-inflammatoires par *L. casei* fait intervenir la production de NO et l'activation de NF κ B.

Les résultats présentés dans le tableau I ci-après montrent que l'addition de *L. casei* aux cellules 10 préactivées par le CYTOMIX active également la production d'IL-1 β .

TABLEAU I

Cellule	Préactivation	Stimulation	IL1- β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Caco-2	Aucune	Aucune	ND	ND
Caco-2	CYTOMIX	Aucune	150 \pm 15	75 \pm 11
Caco-2	Aucune	CNCM I-1518	95 \pm 8	ND
Caco-2	CYTOMIX	CNCM I-1518	1254 \pm 55	975 \pm 85
HT-29	Aucune	Aucune	ND	ND
HT-29	CYTOMIX	Aucune	ND	ND
HT-29	Aucune	CNCM I-1518	ND	ND
HT-29	CYTOMIX	CNCM I-1518	908 \pm 63	789 \pm 45

ND : NON DETERMINE

EXEMPLE 3 : EFFET DE *L. CASEI* EN PRESENCE DE LPS DE 15 BACTERIES GRAM $^-$, SUR LA PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE PAR LES LIGNEES DE CELLULES EPITHELIALES DU COLON PRE-ACTIVEES PAR DES CYTOKINES PROINFLAMMATOIRES.

Le protocole est identique à celui de l'exemple 1 ci-dessus, à ceci près que 10 μ g/ml de LPS 20 d'*E. coli* sont ajoutés lors de l'incubation avec l'extrait total de *L. casei*.

Les résultats sont illustrés par la figure 4, qui montre une production importante de NO en l'absence de *L. casei* (cellules stimulées par CYTOMIX + LPS), qui 25 diminue en présence de quantités croissantes de *L. casei*,

jusqu'à revenir au niveau de celle des cellules activées par les cytokines seules.

REVENDICATIONS

- 1) Utilisation d'une souche de bactérie lactique capable de diminuer la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens, pour l'obtention d'une composition régulatrice de la réponse inflammatoire des entérocytes.
- 2) Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que ladite souche est en outre capable d'augmenter la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires
- 3) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite souche bactérienne est une souche de *L. casei*.
- 4) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne est la souche de *L. casei* CNCM I-1518.
- 5) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite composition est sous la forme d'un complément alimentaire.
- 6) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite composition est sous la forme d'un produit laitier fermenté.
- 7) Procédé de criblage de nouvelles souches de bactéries lactiques dotées de propriétés modulatrices de l'immunité non-spécifique, caractérisé en ce qu'il comprend la sélection de souches de bactéries lactiques capables d'inhiber la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens.
- 8) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de sélection des souches capables d'augmenter la production

de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires, et optionnellement, une étape de sélection des souches n'exerçant aucun effet sur la production de NO par des entérocytes non-activés.

5 9) Procédé selon une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que lesdites souches sont ciblées à partir de cultures de bactéries lactiques choisies dans le groupe constitué par les lactobacilles, les lactocoques, les streptocoques et les
10 bifidobactéries.

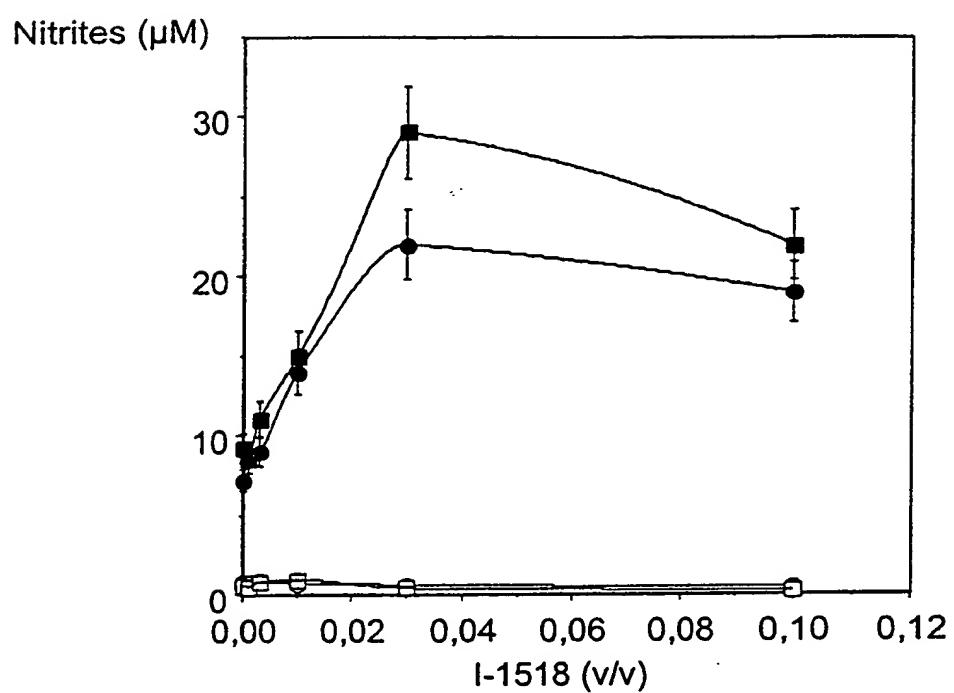
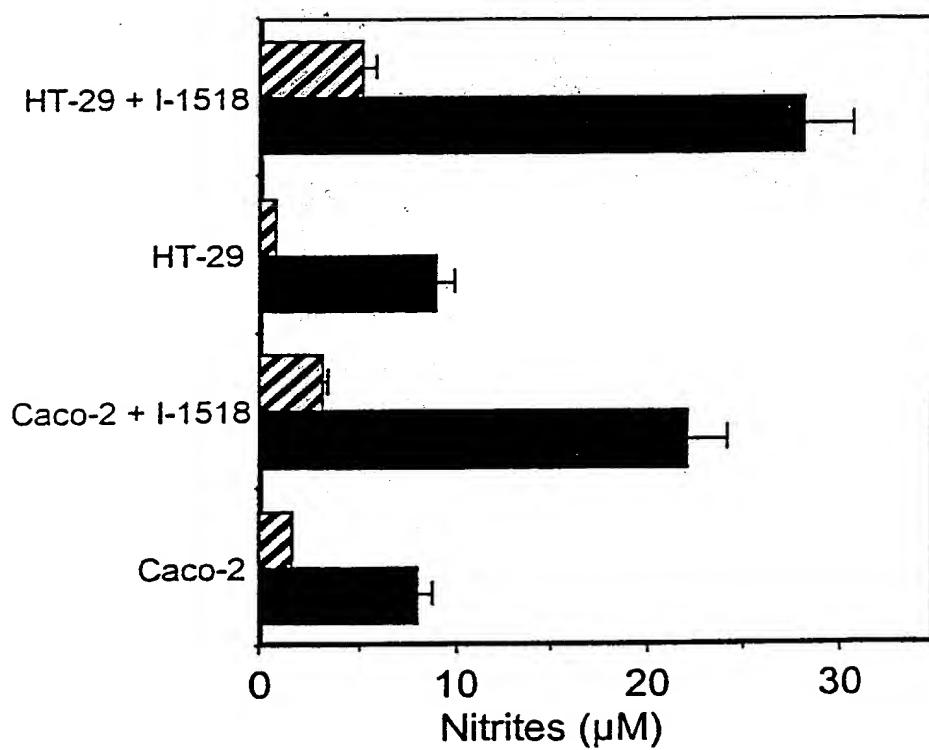


FIG. 1.

**FIG. 2.**

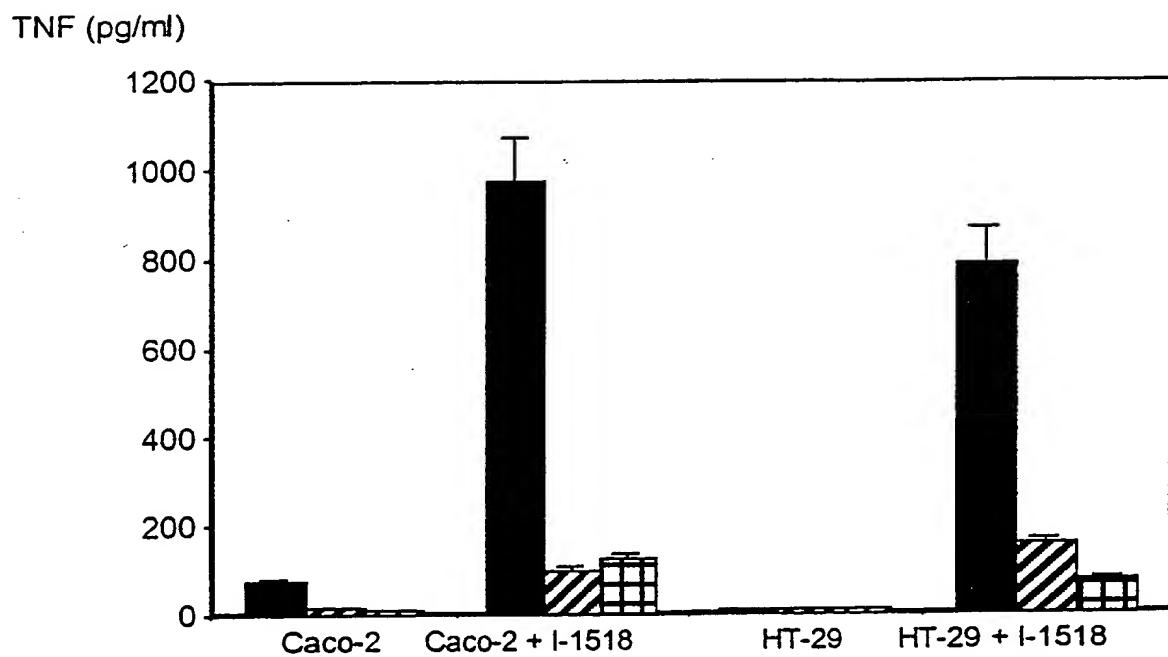


FIG. 3.

414

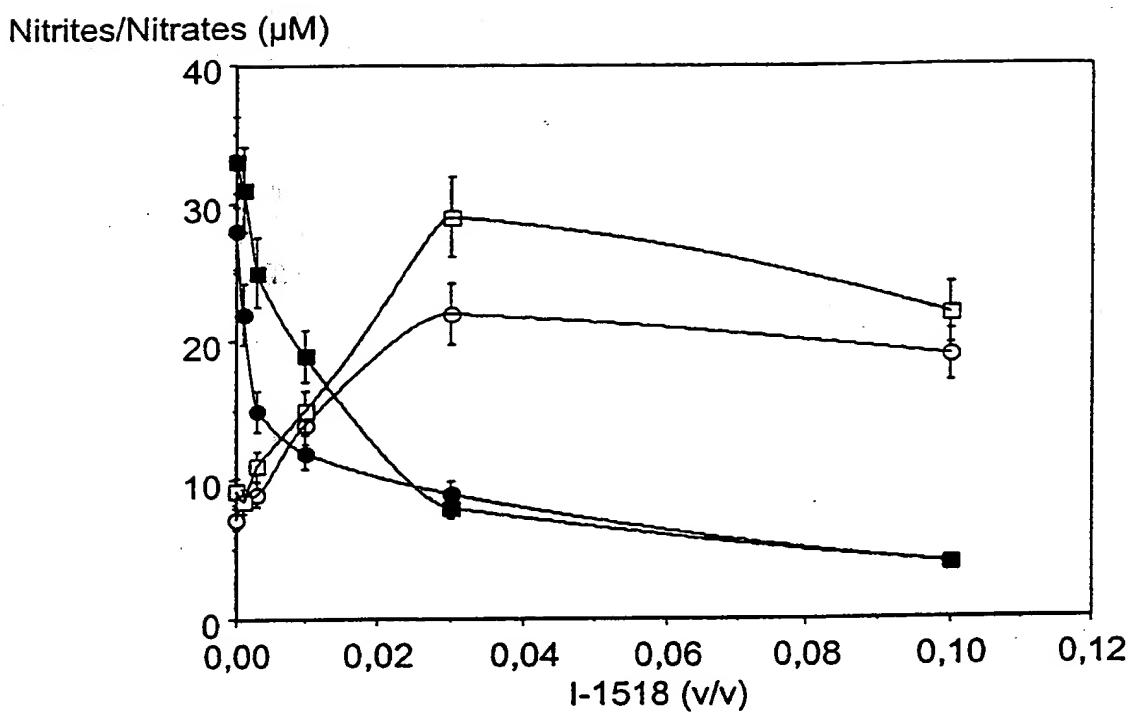


FIG. 4.